

Syrian hamster embryo 세포와 mouse embryo BalB/c 3T3 세포에서의 bisphenol A의 세포 형질전환 연구

김종원¹ · 한익식¹ · 박미선¹ · 엄미옥¹ · 전해승¹ · 민수진¹ · 김인숙¹ · 정해관¹ · 심웅섭² · 오혜영^{1*}
¹식품의약품안전청 국립독성연구소 유전독성과, ²고려대학교 생물학과

Cell transformation of bisphenol A in Syrian hamster embryo cells and mouse embryo BalB/c 3T3 cells

Jong Won Kim¹, Eui Sik Han¹, Mi Sun Park¹, Mi Ok Eom¹, Hye Seung Jun¹, Su Jin Min¹,
In Sook Kim¹, Hai Kwan Jung¹, Woong Seop Sim², and Hye Young Oh^{1*}

¹Genetic Toxicology Division, National Institute of Toxicological Research, Korea Food and Drug Administration, 5 Nokbundong, Eunpyungku, Seoul, 122-704, Korea

²Molecular Biology Laboratory, Department of Biology, Korea University, 5 Anamdong Sungbukku, Seoul, 136-701, Korea

(Received, February 9, 2001 / Accepted, March 8, 2001)

ABSTRACT : To identify nongenotoxic carcinogen determined as negative by ICH guideline-recommended standard genotoxicity test battery; Ames test, chromosome aberration assay, mouse lymphoma tk⁺ assay, *in vivo* micronucleus assay, we picked bisphenol A as a model compound. In this study, we applied *in vitro* BalB/c 3T3 cell transformation assay and Syrian hamster embryo (SHE) cell transformation assay. Bisphenol A was treated upto 769.2 ug/ml in BalB/c 3T3 cells and upto 125 ug/ml in SHE cells. bisphenol A didn't induced morphological transformation both with one stage treatment protocol and with two stage treatment protocol. But, treated for 48 hr, Bisphenol A induced morphological transformation significantly in SHE cells.

Keywords : *In vitro* BalB/c 3T3 cell transformation assay, Syrian hamster embryo (SHE) cell transformation assay, bisphenol A

서 론

발암물질은 유전독성 발현여부에 따라 유전독성 발암물질 (genotoxic carcinogen)과 비유전독성 발암물질(nongenotoxic carcinogen)로 나눌 수 있다(Ashby *et al.*, 1996, 1994, 1991, Yamasaki *et al.*, 1996). 유전독성 물질은 그 위해성을 유전독성시험법을 이용하여 쉽게 검색할 수 있어(ICH, 1995, 1997; OECD guideline; 유전독성과, 1999) 그 위해성을 예측하여, 사용을 규제하거나 독성을 경감시킬 수 있는 방법을 모색할 수 있다(Oh *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 1999; Han *et al.*, 1999). 그러나 비유전독성 발암물질은 유전독성시험법에서 발견이 되지 않아 그 위해성을 예측하기가 쉽지 않다. 유전독성 발암물질은 유전물질과 반응하거나 또는 직접 변화를 시키는 물질로서 유전독성 발암물질에 의해 유도되는 발암기전이 많이 밝혀져 있다. 그러나 비유전독

성 발암물질은 유전물질과 반응하거나 또는 직접 변화시키지 않고 간접적으로 암을 유발할 수 있다(Roy *et al.*, 1999). 암은 유전적 변이의 축적으로 야기되며, 많은 비유전독성 발암물질이 간접적으로 유전독성(genotoxic event)을 나타내는 기작은 거의 밝혀져 있지 않다.

내분비계 장애추정물질로 알려진 bisphenol A는 Chinese hamster lung V79 cell line에서 DNA adduct를 형성하였고, 염색체숫적이상(aneuploidy)를 유발하였으며(Pfeiffer *et al.*, 1997), Syrian hamster embryo(SHE) cell에서 DNA adduct 형성, 염색체숫적이상(aneuploidy) 및 세포 형질전환 (cellular transformation)을 유발하였다(Tsutsui *et al.*, 1998). 또한 bisphenol A는 세포독성을 보이는 농도(IC₄₀)에서 DNA 생합성을 억제하여 염색체구조이상을 나타내었다(Hillard *et al.*, 1998; Galloway *et al.*, 1998).

본 연구에서는 기존에 비유전독성 발암물질로 알려진 물질인 내분비계 장애추정물질들 중에서 ICH가 권유하는 표준 유전독성 시험법으로서 검색이 되지 않았던 bisphenol A를

*To whom correspondence should be addressed

선정하여 마우스 배아세포 BalB/c 3T3 세포주와 씨리언 햄스터 초대 배양세포에서의 세포 형질전환 시험을 통하여 비유전독성 발암물질을 확인할 수 있는 방법을 연구하여, 암 유발, 유전성 질환, 기형발생 등의 가능성을 사전에 예측하고자 하며, 비유전독성 발암물질의 세포내 작용기전 연구를 위한 기초자료로서 사용하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

Bisphenol A (BPA, CAS no. 80-05-7), 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), 3-methylcholanthrene (MCA)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis MO, USA)에서, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), RPMI 1640 medium와 Fetal Bovine Serum (FBS), Donor Calf serum (DCS)은 GibcoBRL (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다.

BalB/c 3T3 세포 형질전환 시험

가. 세포주 및 세포배양

마우스 배아세포인 BalB/c 3T3 Clone A31은 ATCC로부터 구입하였다. 배양액은 10% DCS과 1%의 penicillin-streptomycin을 포함한 DMEM과 F-12 nutrient mixture, L-glutamine를 포함하는 배지를 사용하였으며, 포화 습도 하에서 5% CO₂를 공급하는 37°C의 Dual CO₂ incubator (Shel-lab 1845 TC, U.S.A)에서 배양하였다. 배양된 세포는 3~4일 마다 0.25% trypsin-EDTA용액을 이용하여 계대 유지하였다. 형질전환시험에서의 배양액은 serum의 농도를 2%로 줄였으며, 나머지 nutrient 성분들도 2%이하로 낮추어 주었다.

나. 시험물질의 처리

일단계 세포 형질전환 시험에서는 표준시험방법인 72시간 처리방법을 채택하였다(Matthew *et al.*, 1993). 배지는 일주일애 두 번씩 교환해주었다. 이단계 세포 형질전환 시험에서는 100 µg/ml MCA를 4시간 처리하였으며, phosphate buffered saline (PBS)를 이용하여 2~3차례 washing후 배지를 바꿔주었다. 4~6×10³/T25로 세포수를 조정한 후 일주일 후 시험물질을 14일 처리하였다(Shoji *et al.*, 1997).

다. 농도설정을 위한 세포독성시험

직경 60 mm의 petri dish 또는 T25 culture flask에 200~250 cells/5 ml 되도록 파종하여 1일간 배양한 후, 각각 시험물질과 양성대조물질 등을 함유하는 배양액으로 교환하여 72시간 배양하였다. 그후 배지를 바꾸어주고, 7~10의 발현시간을 두었다. 메탄올로 고정한 후 5% 크리스탈 바이올

렛 또는 5% 김사용액으로 염색하였다. 상대적 생존율(RS, relative survival) 80~90% 감소를 보이는 농도를 본 시험에서의 최고농도로 결정하였다

라. 세포형질전환시험

각 농도당 12 dish를 사용하여, 직경 60 mm의 petri dish에 1×10⁴ cells/5 ml 되도록 파종하여 1일간 배양한 후, 각각 시험물질과 양성대조물질 등을 함유하는 배양액으로 최종 0.5%가 되도록 하여 72시간 배양하였다. 처리시간이 끝난 후 신선한 배지로 교환하고, 3~4일에 한번씩 배지를 교환하여 4주후에 메탄올로 고정한 후 5% 크리스탈 바이올렛 또는 5% 김사용액으로 염색하여, 입체현미경으로 foci를 관찰하였다. 세포독성시험도 병행하였다. 통계학적으로 유의성 있게 용량 의존적으로 증가하거나 하나 이상의 용량단계에서 재현성 있게 양성반응을 나타낼 경우를 양성으로 하였다.

이단계 세포 형질전환 시험에서는 각 농도당 T25 culture flask(25 cm²)를 이용하여 파종 이틀후 시험물질을 처리하였으며, 5 µg/ml MCA를 4시간 처리하였으며, PBS를 이용하여 2~3차례 washing후 배지를 바꿔주었다. 4~6×10³/T25로 세포수를 조정한 후 일주일후 시험물질을 14일 처리하였다. 직경이 ≥2 mm인 것을 foci type II & III로 계수하였다.

$$\text{형질전환율 (\%)} = \frac{\text{형질전환된 foci의 수/세포수 (처리군)}}{\text{형질전환된 foci의 수/세포수 (음성대조)}} \times 100$$

SHE 세포 형질전환 시험

가. 시험계 및 사육환경

실험동물은 식품의약품안전청의 barrier 시설내에서 생산사육된 암수 Golden Syrian Hamster를 동물사육조건(온도 23 ± 1°C, 습도 55±5%, 배기 10-18회/hr, 형광등 명암 12 hr cycle, 조도 300-500 Lux)의 사육환경에서 폴리카보네이트 사육상자(70 W×240 L×120 Hmm 진주, 크기 확인할 것)에 사육하였으며, 1주일간의 순화사육기간동안에 관찰하여 체중이 평균이상이며, 특이한 외형상의 문제점이 나타나지 않는 동물만 시험에 사용하였다. 매일 오전 9시에서 10시 사이에 질분비물 검사를 실시하여 성주기를 파악하였으며, 교배는 질분비물을 보인 암컷들을 3일 후 오후 4시에서 6시 사이에 암컷과 수컷을 1:1로 교배시켰다. 다음날 아침 질전(vaginal plug)을 확인할 수 있거나, 질도말법으로 정자가 발

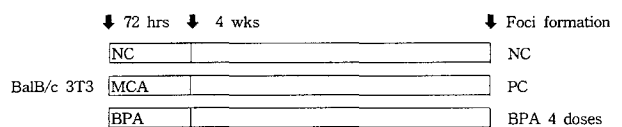


Fig. 1. Scheme of in vitro BalB/c 3T3 one stage transformation. NC, negative control : only treated 0.1% DMSO; PC, positive control: 5 µg/ml MCA.

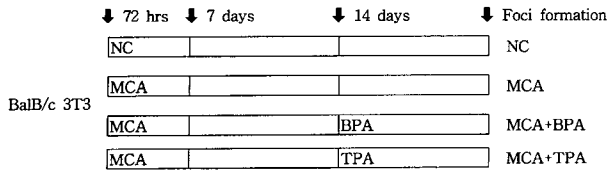


Fig. 2. Scheme of *in vitro* BalB/c 3T3 two stage transformation. NC: only treated 0.1% DMSO instead MCA and BPA; MCA, only treated with 5 µg/ml MCA for 4 hrs, seeded at 2×10^4 cells/flask (25 cm^2), then followed by another 21 day-culture; MCA+BPA: treated with 5 µg/ml MCA for 4 hrs, seeded at 2×10^4 cells/flask (25 cm^2), and cultured for 7 days, then treated with various concentration of BPA for 14 days; MCA+TPA: treated with 5 µg/ml MCA for 4 hrs, seeded at 2×10^4 cells/flask (25 cm^2), and cultured for 7 days, then treated with 100 ng/ml TPA for 14 days.

견된 것을 임신 동물로 하고 이날의 새벽 0시를 임신 0일로 간주하였다. 임신된 female hamster는 cage당 1수씩 수용하였다. 사료는 신촌사료회사에서 실험동물사료를 구입하여 고압증기 멸균기에서 121°C , 15분간 멸균한 다음, 사료와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다.

나. primary embryo 분리

배자의 배양방법은 임신 13일째 되는 날, 임신이 확인된 햄스터를 오후 1시부터 2시 사이에 경추탈구시켜 도살한 다음, 70% 에탄올로 복부를 닦은 후 개복하여 오염이 되지 않도록 주의하면서 자궁을 모체로부터 적출하였다. 무균적으로 적출한 자궁을 멸균된 PBS가 담긴 petri dish로 옮겨 clean bench내에서 미세가위를 이용하여 자궁체로부터 수태산물을 제거한 다음 forcepes을 이용하여 자궁벽을 절개하여 배자가 들어있는 탈락막(decidua)을 노출시켰다. 입체현미경 하에서 미세한 Watchmaker's forceps을 이용하여 탈락막을 제거하여 배자를 분리시킨 후, 난황낭, 양막, 그리고 ectoplacental cone을 건드리지 않도록 주의하면서, Reichert's membrane을 조심스럽게 제거하였다. 이와 같이 적출된 배자들을 chopping하였으며, 0.25% trypsin-EDTA를 이용하여 단세포로 분리하였다.

배양배지는 20% FBS를 함유한 DMEM 배지를 사용하였으며, 계대배양시에서는 10% FBS를 함유한 배지를 사용하였다. 5%-10%의 이산화탄소 배양기에서 배양하였다. Bicell을 이용하여 일반 세포주의 경우처럼 cryogenic vial에 aliquot해서 액체질소통에 보관하였다. 세포를 사용할 때 액체질소통에서 thawing하여, cell passage 2-5를 사용하였다.

다. primary embryo의 형질전환능 확인 및 배양조건

Primary culture한 세포의 activity를 확인하기 위하여 양성대조물질인 Benzo(a)pyrene (B(a)P, 4 µM)에 의해 형질전환된 lot만을 사용하였으며, 반응하지 않는 세포의 pool은 폐기하였다.

라. 예비세포독성시험

Tsutsui 등의 방법(Tsutsui *et al.*, 1998)을 따라 수행하였으며, 1000 cell/ $\phi 60 \text{ mm}$ dish가 되도록 파종하였으며, 2일간 시험물질 처리후 신선한 배지로 교환후 7일째에 수확하였다. 배지를 버리고 메탄올 고정 후 공기중 건조한 후에 김사 염색하였으며, 입체현미경 및 도립현미경을 이용하여 관찰하였다. 세포독성을 보이는 경우, 음성대조군에 비하여 50% 성장억제(상대적 콜로니-생성율, relative colony-forming efficiencies [CFE])를 보이는 농도를 본시험에서 최고농도로 결정한다. 세포독성이 없는 무독성 물질의 경우, 최고농도 5000 µg/ml 또는 10 mM 중 낮은 농도를 최고농도로 하여 본시험을 진행한다.

마. 세포 형질전환시험

예비세포독성시험에서 결정된 최고농도와 공비 2로 희석된 3농도를 포함하여 음성대조군, 양성대조군을 두었다. 직경 60 mm dish에 1000 세포가 되도록 각 군당 40 dish를 파종하였으며, 2일간 시험물질 처리후 신선한 배지로 교환후 7일째에 수확하였다. 배지를 버리고 메탄올 고정 후 공기중 건조한 후에 김사 염색하였으며, 입체현미경 및 도립현미경을 이용하여 관찰하였다. 세포독성을 보이는 경우, 음성대조군에 비하여 50% 성장억제(상대적 생존율, relative survival)를 보이는 농도를 본시험에서 최고농도로 결정하였다. 세포독성이 없는 무독성 물질의 경우, 최고농도 5000 µg/ml 또는 10 mM 중 낮은 농도를 최고농도로 하여 본시험을 진행하였다(유전독성과, 1999).

마. 판독 및 통계처리

Lebouf 등의 방법(Gibson *et al.*, 1997)에 따라 입체현미경 하에서 형질전환 콜로니(transformant colony)를 판독하였다. 교차성장(criss-crossing)과 다층성장(multi-layered growth pattern)을 보이는 콜로니를 형질전환 콜로니로 판정하였다. 총 형성된 colony 중에서 형질전환 콜로니의 비율로 나타내었다. Analysis of variance (ANOVA) 및 T-test를 수행하였다.

결 과

BalB/c 3T3 세포 형질전환 시험

가. 세포독성

BPA는 세포 형질전환 시험에서의 최고농도 결정을 위하여 세포독성을 결정하였는데, 769.2 µg/ml를 세포형질전환시험에서의 최고농도로 결정하였다(Fig. 3).

나. 세포 형질전환 시험

일단계 세포 형질전환 시험에서 BPA는 처리된 모두 농도 단계에서 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 4). 이단계 세포 형질전환 시험에서

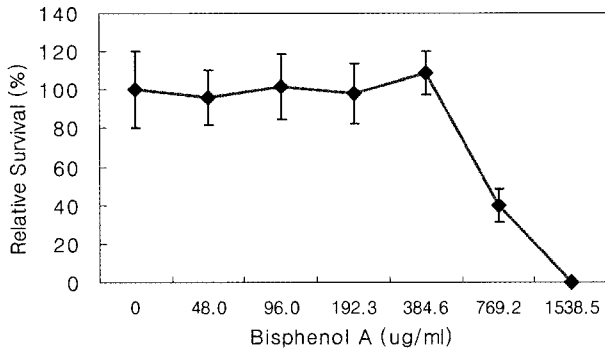


Fig. 3. Cytotoxicity of bisphenol A using clonal survival assay in mouse embryo BalB/c 3T3 cells.

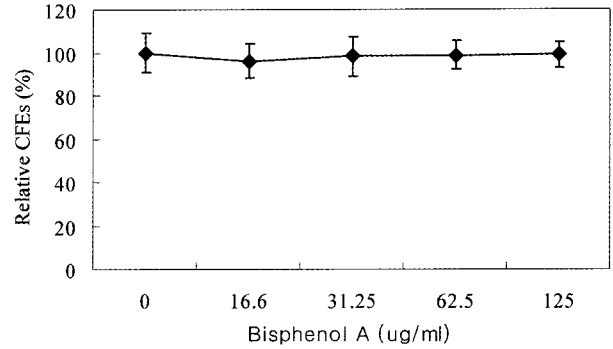


Fig. 6. Cytotoxicity of bisphenol A for 48 hrs in Syrian hamster embryo cells.

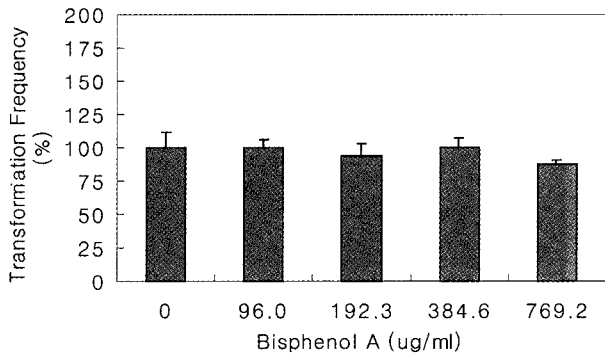


Fig. 4. One stage cell transformation of bisphenol A in mouse embryo BalB/c 3T3 cells.

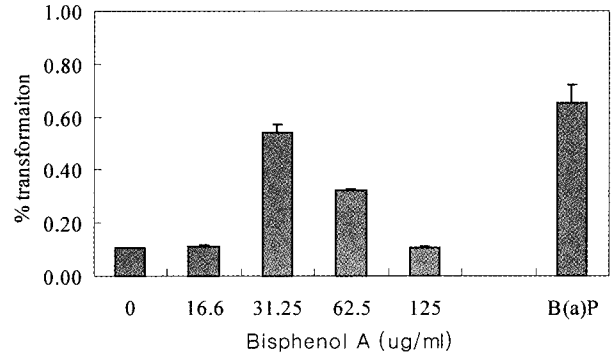


Fig. 7. Transformed colony frequency of bisphenol A for 48 hrs in Syrian hamster embryo cells.

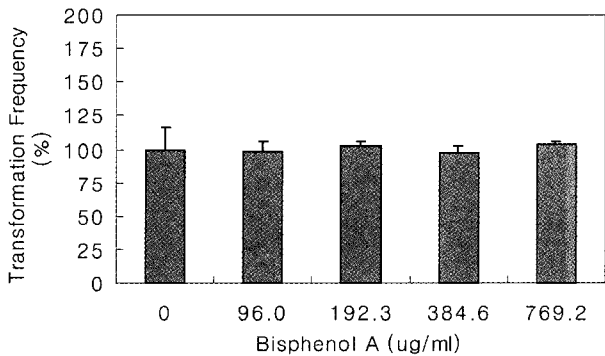


Fig. 5. Two stage cell transformation of bisphenol A in mouse embryo BalB/c 3T3 cells.

BPA도 처리된 모두 농도 단계에서 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이가 없어 음성으로 나타내었다 (Fig. 5).

SHE 세포 형질전환 시험

가. 세포독성

BPA는 적용된 125, 62.5, 31.25, 16.6 μg/ml의 모든 농

도에서 유의적인 세포독성을 관찰할 수 없었다(Fig. 6).

나. 세포 형질전환 시험

BPA는 SHE cell에 48시간 처리시 31.125~62.5 μM에서 유의성있는 반응을 나타내었다(p<95%). (Fig. 7).

고 찰

BPA는 표준 유전독성시험법으로 잘 알려진 미생물을 이용한 복귀돌연변이시험(Schweikl *et al.*, 1998; Ashby *et al.*, 1991; Haworth *et al.*, 1983; Anderson *et al.*, 1978), 염색체이상시험(Ivett *et al.*, 1989; Ashby *et al.*, 1991) 마우스 림포마 tk⁺ 유전자 돌연변이시험(Myhr *et al.*, 1991) 생체내 소핵시험에서 모두 음성의 결과를 나타내었다. 또한 다른 endpoint의 유전독성시험에서도 음성의 결과를 나타내었다. 즉, Na⁺/K⁺ ATPase locus와 hprt 유전자 돌연변이시험에서 음성의 결과를 보였으며(Tsutsui *et al.*, 1998; Schweikl *et al.*, 1998), CHO 세포를 이용한 자매염색분체 교환시험(Galloway *et al.*, 1998; Ivett *et al.*, 1989), 초파리 날개의 체세포 변이와 재조합시험(Foureman *et al.*,

1994), BalB/c 3T3 세포를 이용한 세포 형질전환시험법에서도 음성을 나타내었다(Tennant and Ashby, 1991). 그러나 BPA는 내분비계 장애 추정물질로서 MCF-7 세포를 이용한 E-screen assay 및 glucose 6 phosphate dehydrogenase에서 양성의 결과를 보였으며(길광섭등, 1999; 김부영 등, 1999), 본 연구자들의 human estrogen receptor 발현 형질전환 효모균주를 이용한 시험법에서도 양성의 결과를 보여 내분비계 장애기전을 보임을 알 수 있었다(정해관등, 1999). 또한 최근의 보고에 의하면 독성을 보이는 농도에서는 염색체 손상성을 보임을 알려지고 있으며(toxic clastogen)(Galloway *et al.*, 1998), Syrian hamster embryo (SHE) 세포 및 rat에서 32P-postlabeling법을 이용한 DNA adduct 시험에서 BPA는 bisphenol o-quinone으로 대사되어 DNA adduct 형성을 증가시킨다고 하였다(tsutsumi *et al.*, 1998; Atkinson and Roy, 1995). *in vitro* microtubule assemble assay에서 양성을 보였는데, microtubule 형성을 억제하여 유사분열 방추사(mitotic spindle) 형성을 방해하고 유사분열 억제(mitotic arrest)를 유도하여(Pfeiffer *et al.*, 1997) 이수성을 보이는 것으로 알려졌다. 차이니즈 햄스터 폐 세포인 V79세포에서 이수성 및 소핵을 형성한다고 보고되었으며(Pfeiffer *et al.*, 1997), CREST 염색을 이수성 분석을 통하여 전 염색체 또는 염색체분체가 함유되어진 것으로 생각되어졌다.

본 연구자들의 연구결과(Kim *et al.*, 2000)에서도 BPA는 사람 유방 유래 MCF-7 세포에서 소핵을 형성하였으며, polynuclear(PN) cell과 mitotic(M) cell중 PN cell을 특이적으로 증가시키는 aneugen으로 생각되어졌다. 이는 microtubule assembly의 저해제로 작용하여 소핵을 형성하며, CREST 염색법에 의한 이수성을 보인다는 다른 연구자의 보고와 일치한다(Pfeiffer *et al.*, 1997).

본 연구에서 비유전독성 발암물질의 공통적인 성질중의 하나인 이수성에 의한 세포 형질전환을 살펴보고자 하였다. 또한 비유전독성 발암물질의 공통적인 성질인 조직특이성, 종 특이성, 성특이성 중에서 종특이성을 살펴보기 위하여 마우스 배아세포와 씨리언 햄스터 배아세포를 선정하였으며, 일 단계 세포형질전환과 이단계 세포형질전환 시험법을 적용하여 영향을 살펴보고자 하였다.

세포 형질전환 시험은 초대 배양 세포 또는 확립된 세포주에 화학물질 등에 의한 형태적 변형을 지표로 하여 화학물질의 발암성을 예측할 수 있는 시험법으로서, C3H/10T1/2 clone 8, BalB/c 3T3 clone A31, Syrian hamster embryo 세포(Dertinger *et al.*, 1998)등을 사용하고 있다. 마우스 배아 C3H/10T1/2세포를 이용한 세포형질전환시험은 초기 연구에 많이 사용되었으나, 지금은 많이 사용하지 않고 있다.

마우스 배아 BalB/c 3T3 세포를 이용한 세포 형질전환 시험은 미국 국가 독성 프로그램(NTP, National Toxicology Program)에서 사용하며, 신약, 의료용구 등의 인허가를 위한 비임상자료의 제출시 우수 실험실 규정(GLP)에 적합한 유전독성시험자료로 제출되고 있다. SHE 세포를 이용한 세포 형질전환시험은 OECD draft guideline에 올라있으며(OECD *et al.*, 2000), FDA, EPA, 제약사 등의 유전독성연구자들이 표준 유전독성시험법에서 검색이 안되는 비유전독성 발암물질의 검색을 위하여 regulatory 측면에서 검토중에 있다. 1999년 IWGTP(Internation Workshop on Genetic Toxicology Procedure)에서 그 유용성이 더욱 더 대두되고 있다. 본 연구에서는 BalB/c 3T3 세포 형질전환 시험과 SHE 세포 형질전환 시험을 적용하였는데, BalB/c 3T3 세포 형질전환 시험에서 bisphenol A는 일단계 및 이단계 세포 형질전환 시험에서 모든 농도군에서 음성대조군과 비교하여 유의적인 차가 없어 음성의 결과를 보였으나, SHE 세포 형질전환 시험에서 48시간 처리 후 양성을 보였다. 또한 마우스 배아세포에서는 음성의 결과를 보였으나 씨리언 햄스터 배아세포에서의 양성의 결과를 보이는 것으로 보아 종 특이성을 보임을 알수있었다. 또한 Bisphenol A의 경우 전형적인 유전독성물질과는 다른 기전인 이수성 기전으로 인한 세포 형질전환능을 획득하는 것으로서 판단되어졌다. 이수성 기전으로 인한 세포 형질전환의 분자생물학적인 연구가 진행되어져야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 식품의약품안전청 국립독성연구소 연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Andersen, H.R., Andersson, A.M., Arnold, S.F., Autrup, H., Barfoed, M., Beresford, N.A., Bjerregaard, P., Christiansen, L.B., Gissel, B., Hummel, R., Jorgensen, E.B., Korsgaard, B., Le Guevel, R., Leffers, H., McLachlan, J., Moller, A., Nielsen, J.B., Olea, N., Oles-Karasko, A., Pakdel, F., Pedersen, K.L., Perez, P., Skakkeboek, N.E., Sonnenschein, C., Soto, A.M., Sumpter, J.P., Thorpe, S.M. and Grandjean, P. (1999): Comparison of Short-Term Estrogenicity Tests for Identification of Hormone-Disrupting Chemicals, *Environ Health Perspect.*, **107**(Suppl 1): 89-108.
- Ashby, J., and Tennant, R.W. (1991): Definitive relationships among chemical structure, carcinogenicity and mutagenicity for 301 chemicals tested by the U.S. NTP, *Mutat. Res.*, **257**: 229-306. published erratum appears in *Mutat. Res.*, (1994) **317**: 175.

- Ashby, J., Brady, A., Elcombe, R., Elliott, B.M., Ishmael, J., Odum, J., Tugwood, J.D., Kettle, S. and Purchase, I.F.H. (1994): Mechanistically-based human hazard assessment of peroxisome proliferator-induced hepatocarcinogenesis, *Human & Experimental Toxicology*, **13**(sup.2): S1-S117.
- Ashby, J., Morrod, R.S. (1991): Detection of human carcinogens., *Nature*, **352**: 185-6.
- Ashby, J., Water, M.D., Preston, J., Adler, I.D., Gouglas, G.R., Fielder, R., Shelby, M.D., Anderson, D., Sofuni, T., Gopalan, H.N.B., Becking, G., and Sonich-Mullin, C. (1996): IPCS harmonization of methods for the prediction and quantification of human carcinogenic/mutagenic hazard, and for indicating the probable mechanism of action of carcinogens, *Mutat. Res.*, **352**: 153-157.
- Atkinson, A., and Roy, D. (1995): In vivo DNA adduct formation by bisphenol A., *Environ. Mol. Mutagen.*, **26**: 60-6.
- Dertinger SD, Silverstone AE, Gasiewicz TA: Influence of aromatic hydrocarbon receptor-mediated events on the genotoxicity of cigarette smoke condensate., *Carcinogenesis* **19**(11): 2037-42, 1998.
- Foureman, P., Mason, J.M., Valencia, R., and Zimmering, S. (1994): Chemical mutagenesis testing in Drosophila. X. Results of 70 coded compounds tested in National Toxicology Program, *Environ. Mol. Mutagen.*, **23**: 208-227.
- Galloway, S.M., Miller, J.E., Armstrong, M.J., Bean, C.L., Skopek, T.R. and Nichols, W.W. (1998): DNA synthesis inhibition as an indirect mechanism of chromosome aberrations: comparison of DNA-reactive and non-DNA-reactive clastogens, *Mutat. Res.*, **400**: 169-186.
- Gibson, D.P., Brauningner, R., Shaffi, H.S., Kerckaert, G.A., LeBoeuf, R.A., Isfort, R.J. and Aardema, M.J. (1997): Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: Comparison to results in the SHE cell transformation assay for national toxicology program test chemicals, *Mutat. Res.*, **392**: 61-70.
- Han, E.S., Kim, J.W., Park, C.H., Eom, M.O., Kang, I.H., Kang, H.J., Ha, K.W. and Oh, H.Y. (1999): Anti-genotoxicity Study of Ecklonia stolonifera, Edible Brown Algae, in *in vitro* Mouse Lymphoma tk⁺ Assay in L5178Y 3.7.2C cells and *in vivo* Micronucleus Assay in ddY Mice Bone Marrow Cells: *Autumn meeting of Korean Association of Cancer Prevention*, Seoul, Korea.
- Haworth, S., Lawlor, T., Mortelmans, K., Speck, W., and Zeiger, E. (1983): Salmonella mutagenicity test results for 250 chemicals, *Environ. Mutagen.*, **5** (Supp. 1): 3-142.
- Hilliard, C.A., Armstrong, M.J., Bradt, C.I., Hill, R.B., Greenwood, S.K. and Galloway, S.M. (1998): Chromosome aberrations *in vitro* related to cytotoxicity of nonmutagenic chemicals and metabolic poisons, *Environ. Mol. Mutagen.*, **31**: 316-326.
- ICH, Topic S2A, Genotoxicity (1995): Guidance on specific aspects of regulatory genotoxicity tests for pharmaceuticals, international conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, harmonised tripartite guideline CPMP/ICH/141/95, Approved September 1995, <http://www.ifpma.org>.
- ICH, Topics S2B, Genotoxicity (1997): A standard battery for genotoxicity testing of pharmaceuticals, international conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, Step 4 Document, July 1997, <http://www.ifpma.org>.
- Ivett J.L., Brown, B.M., Rodgers, C., Anderson, B.E., Resnick, M.A., and Zeiger, E. (1989): Chromosome aberration and sister chromatid exchange tests in Chinese hamster ovary cells *in vitro* IV: Results for 15 chemicals, *Environ. Mol. Mutagen.*, **16**: 165-187.
- Kim, J.W., Park, C.H., Kim, I.S., Han, E.S., Sohn, S.J., Ha, K.W. and Oh, H.Y. (1999): Anti-clastogenicity Study of Ellagic Acid - *in vitro* chromosome aberration and micronucleus assay in Chinese Hamster Lung Fibroblast cells and *in vivo* micronucleus assay in Bone Marrow cells of ddY mice, *Autumn meeting of Korean Association of Cancer Prevention*, Seoul, Korea.
- Kulling, S.E., Jacobs, E., Pfeiffer, E., and Metzler, M. (1998): Studies on the genotoxicity of the mammalian lignans enterolactone and enterodiol and their metabolic precursors at various endpoints *in vitro*, *Mutat. Res.*, **406**: 115-124.
- Matthew E.J. and many scientist : Transformation of BalB/c 3T3 cells, *Environ Health Perspect*, **101**(S2): 277-482, 1993.
- Myhr, B.C. and Caspary, W.J. (1991): Chemical mutagenesis at the TK locus in L5178Y mouse lymphoma cells. I. Results for 31 coded compounds in the National Toxicology Program, *Environ. Mol. Mutagen.*, **18**: 51-83.
- OECD guideline, Genetic toxicology, <http://www.oecd.org/ehs/test/health.htm>, 19 December 2000.
- OECD guideline, Genetic toxicology, TG no 471-478, <http://www.oecd.org/ehs/test/health.htm>.
- Oh, H.Y., Han, E.S., Kim, J.W., Eom, M.O., Lee, J.H., Choi, J.S. and Ha, K.W. (1999): Antimutagenic Effects of Ecklonia stolonifera, an Edible Brown Algae Present in Korea against chemical mutagen: *Environ. Mol. Mutagen.*, **31**(S29): 58.
- Pfeiffer, E., Resenberg, B., Deuschel, S. and Metzler, M. (1997): Interference with microtubule and induction of micronuclei *in vitro* by various bisphenols, *Mutat. Res.*, **390**: 21-30.
- Roy, D., and Liehr, J.G. (1999): Estrogen, DNA damage and mutations, *Mutat. Res.*, **424**: 107-15.
- Roy, D., Colerangle, J.B., and Singh, K.P. (1998): Is exposure to environmental or industrial endocrine disrupting estrogen-like chemicals able to cause genomic instability?, *Front Biosci.*, **6**: 913-21.
- Roy, D., Palangat, M., Chen, C.-W., Thomas, R.D., Colerangle, J., Atkinson, A. and Yan, Z.-J. (1997): Biochemical and molecular changes at the cellular level in response to exposure to environmental estrogen-like chemicals, *J. Toxicology and Environmental Health*, **50**: 1-29.
- Schweikl, H., Schmalz, G., and Rackebrandt, K. (1998): The mutagenic activity of unpolymerized resin monomers in Salmonella typhimurium and V79 cells, *Mutat. Res.*, **415**: 119-30.
- Shoji, A., Sakamoto, Y., Tsuchiya, T., Moriyama, K., Kaneko, T., Okubo, T., Umeda, M. and Miyazaki, K. (1997): Inhibition of tumor promoter activity toward mouse fibroblasts and their *in vitro* transformation by tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1), *Carcinogenesis*, **18**: 2093-100.

- Shoji, A., Sakamoto, Y., Tsuchiya, T., Moriyama, K., Kaneko, T., Okubo, T., Umeda, M. and Miyazaki, K. (1997): Inhibition of tumor promoter activity toward mouse fibroblasts and their in vitro transformation by tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1), *Carcinogenesis*, **18**: 2093-100.
- Tennant, R.W., and Ashby, J. (1991): Classification according to chemical structure, mutagenicity to Salmonella and level of carcinogenicity of a further 39 chemicals tested for carcinogenicity by the U.S. National Toxicology Program. *Mutat. Res.*, **257**: 209-27.
- Tsutsui, T., Tamura, Y., Yagi, E., Hasegawa, K., Takahashi, M., Maizumi, N., Yamaguchi, F. and Barrett, J.C. (1998): Bisphenol-A induces cellular transformation, aneuploidy and DNA adduct formation in cultured syrian hamster embryo cells, *INT. J. Cancer*, **75**: 290-294.
- Yamasaki, H., Ashby, J., Bignami, M., Jongen, W., Linnainmaa, K., Newbold, R.F., Nguyen-Ba, G., Parodi, S., Rivedal, E., Schiffmann, D., Simons, J.W., and Vasseur, P. (1996): Non-genotoxic carcinogens: development of detection methods based on mechanisms: a European project, *Mutat. Res.*, **353**: 47-63.
- 길광섭, 한순영, 장성재, 김형식, 한상국, 김규봉, 오세동, 국선숙, 원은하, 장동덕, 안병우, 남기택, 박귀례(1999): 내분비계 장애물질의 검색 및 시험법 확립 I, 내분비계 장애물질 연구보고서, volume 1, Number 111-144, 식품의약품안전청 국립독성연구소.
- 김부영, 서경원, 이선희, 김효정, 박미정, 김규봉, 김준규, 오원석, 김종민, 성승현, 김윤정, 김주일 (1999): 내분비계 장애물질의 검색 및 시험법 확립 II, 내분비계 장애물질 연구보고서, volume 1, Number 147-172, 식품의약품안전청 국립독성연구소.
- 유전독성과 (1999): 의약품등의 독성시험기준, 식품의약품안전청 고시 제1999-61호, 42-45, 74-76, 1999. 12. 22, 식품의약품안전청.
- 정해관, 박미선, 손수정, 박현신, 이진주, 엄미옥, 김종원, 한의식, 오혜영 (1999): 내분비계 장애물질의 검색 및 시험법 확립 III, 내분비계 장애물질 연구보고서, volume 1, Number 173-193, 식품의약품안전청 국립독성연구소.